

Aus der Universitäts-Kinderklinik Würzburg
Direktor: Professor Dr.med. J. S t r ö b e r

1958

ÜBER DIE VERLÄSSLICHKEIT VON GERINNUNGSBESTIMMUNGEN
ZUR LEBERFUNKTIONSDIAGNOSTIK

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius - Maximilians - Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
vorgelegt von

Dietrich Ohling
aus Oldenburg i./O.

Würzburg 1958



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153517_0146

Aus der Universitäts-Kinderklinik Würzburg
Direktor: Professor Dr.med. J. S t r ö d e r

ÜBER DIE VERLÄSSLICHKEIT VON GERINNUNGSBESTIMMUNGEN
ZUR LEBERFUNKTIONSDIAGNOSTIK

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius - Maximilians - Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
vorgelegt von

Dietrich Ohling
aus Oldenburg i./O.

Würzburg 1958

Referent: Professor Dr. med. W. Künz e r

Korreferent: Professor Dr. med. J. Strö d e r

Tag der Promotion:

12. 6. 58

Dem Andenken meiner verstorbenen Mutter
und meinem lieben Vater
in Dankbarkeit
gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Literatur und Problemstellung	2
III. Methodik und eigene Versuche	4
IV. Ergebnisse	22
V. Diskussion	23
VI. Zusammenfassung	24
VII. Literaturverzeichnis	I

I. EINLEITUNG

Erst seit relativ kurzer Zeit ist bekannt, daß als Bildungsorgan der Gerinnungsfaktoren hauptsächlich die Leber in Frage kommt (R.MARX(14)). Aus diesem Grunde konnten auch erst in neuerer Zeit Gerinnungsbestimmungen zur Unterstützung der Diagnose und Differentialdiagnose von Lebererkrankungen herangezogen werden. Die Beurteilung der Leberfunktion wird durch die neuen Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der selektiven Gerinnungsbestimmungen ohne Zweifel erweitert und erleichtert, was insbesondere bei der Abgrenzung einzelner Formen von Lebererkrankungen von großem Nutzen ist (J.JÜRGENS(7)).

Andererseits ist die Beobachtung schon sehr alt, daß bei ikterischen Patienten erhöhte Blutungsneigung auftritt. Man spricht von sogenannten cholämischen Blutungen. Damit entsteht die Frage, ob als Ursache für die Beeinträchtigung der Gerinnung ausschließlich die Leber, in ihrer Eigenschaft als Bildungsstätte vieler Gerinnungsfaktoren, anzusehen ist oder ob nicht auch die ins Blut übergetretenen Bestandteile des Gallensekretes die Gerinnung beeinträchtigen können. Sollte dies der Fall sein, so wäre die Verlässlichkeit der Gerinnungsbestimmungen für die Leberfunktionsdiagnostik ernstlich gefährdet.

Im Rahmen dieser Arbeit soll deshalb untersucht werden, in welcher Weise das Blutfarbstoffderivat Bilirubin auf Gerinnungsvorgänge einzuwirken im Stande ist.

II. LITERATUR UND PROBLEMSTELLUNG

Das Auftreten von Hämorrhagien bei ikterischen Hepatopathien ist - wie oben erwähnt - schon sehr früh beobachtet worden und gehört nach R.MARX(14) zum alten ärztlichen Erfahrungsgut. In Deutschland soll zum ersten Male G.WEDELS (26) im Jahre 1683 eine tödliche Blutung im Verlauf eines Ikterus gravis beschrieben haben (A.QUICK(26)). An Zusammenhänge zwischen Funktionsdefekten der Leber und hämorrhagischer Diathese dachte man aber damals nicht. Selbst im ersten Drittel des 20.Jahrhunderts ergaben sich noch keine neuen Gesichtspunkte.

Erst als die Gerinnungsforschung in den dreißiger Jahren einen erstaunlichen Aufschwung nahm und plötzlich durch die Veröffentlichung zweier brauchbarer Methoden zur Bestimmung des Prothrombins (E.WARNER, K.BRINKHOUS, H.SMITH(25): Zweistufentechnik der Prothrombinbestimmung - und A.QUICK (23): Einstufentechnik der Prothrombinbestimmung) an Bedeutung gewann, wurden Beziehungen zwischen Dysfunktion der Leber und Blutungsbereitschaft offensichtlich.

QUICK konnte im Jahre 1935 mit der Einstufenmethode ("QUICK-Zeit") eine Verminderung des Prothrombins bei Verschlußikterus feststellen. Derselbe Autor vermutete auch zwischen dem von H.DAM(3) 1935 in Dänemark entdeckten Vitamin K und dem Abfall des Prothrombinspiegels bei Gallengangsverschluß einen Zusammenhang. Im Jahre 1938 fanden dann auch H.DAM und J.GLAVID(3), ferner H.BUTT, A.SNELL und A.OSTERBERG(2), daß sich durch parenterale Verabreichung von Vitamin K beim Verschlußikterus der Prothrombinspiegel wieder normalisieren läßt.

Aus dieser Erkenntnis entwickelte F.KOLLER(11) im Jahre 1941 den sogenannten Vitamin-K-Test, der sich ausgezeichnet zu Differentialdiagnose von Verschlußikterus und

Parenchymerkrankung der Leber eignet. Er beruht auf der Beobachtung, daß beim Verschlußikterus ohne wesentliche zusätzliche Schädigung des Leberparenchyms das Prothrombinpotential nach Vitamin-K-Zufuhr schnell ansteigt, beim Parenchy mikterus aber praktisch unverändert bleibt. Die Ursache hierfür ist die Tatsache, daß beim Verschlußikterus das Vitamin K nicht resorbiert wird und der Prothrombinmangel daher durch Vitamin-K-Mangel bedingt ist. Der Vitamin-K-Test war die erste, auf einer Blutgerinnungsbestimmung basierende Leberfunktionsprobe.

In den Jahren 1943 bis 1953 wurde mit der Entdeckung der sogenannten Acceleratoren Faktor V/VI und Faktor VII (A.QUICK und M.STEFANINI(24); P.OWREN(20); C.OWEN und J.BOLLMANN(19)) und der Methode ihrer differenzierten Bestimmung (A.QUICK(23); F.MARBET und A.WINTERSTEIN(15-17); K.BRINKHOUS, H.SMITH und E.WARNER(25)) die Blutgerinnungsforschung sehr bereichert und die Möglichkeit geschaffen, bei Leberkranken die Faktoren der sogenannten zweiten Gerinnungsphase (Faktor II, Faktor V/VI und Faktor VII) einer Prüfung zu unterziehen.

Darauffolgende Untersuchungen ergaben, daß zwischen Leberfunktion und der Gerinnungsaktivität der Faktoren II, V und VII eindeutige Beziehungen vorhanden sind (K.FORELL und F.KOLLER(5)). Bei Verschlußikterus ist immer eine faßbare Erniedrigung von Faktor II und Faktor VII (sehr selten auch von Faktor V) festzustellen, was einheitlich auf eine mangelnde Resorptionsfähigkeit von Vitamin K zurückgeführt wird. (F.KOLLER(10); A.QUICK(23); J.JÜRGENS(7); H.DAM(3) et al.)

Wenn es sich um Parenchymerkrankungen der Leber handelt, wird in leichteren Fällen eine Aktivitätsminderung von Faktor II und Faktor VII vorgefunden, in schweren Fällen ist außerdem stets ein Absinken von Faktor V zu beobachten. Nach KOLLER ist der Faktor V prognostisch besonders bedeutsam, da seine Aktivität erst bei fortgeschrittener Leberschädigung zu sinken beginnt und - bei einer Erniedrigung unter 20 Prozent der Norm - einen ungünstigen Verlauf der Lebererkrankung voraussehen läßt. Die Faktoren II, VII und auch X reagieren empfindlicher und schneller als Faktor V auf eine hepatozelluläre Schädigung und bleiben auch nach der Ausheilung über

längere Zeit hinaus vermindert. S.WITTE(28) meint, daß eine Aktivitätsabnahme von Faktor VII im Hinblick auf Leberspezifität und quantitative Aussagemöglichkeiten sogar der Thymolprobe überlegen ist.

Nach diesem knappen Überblick drängt sich die Frage nach der Ursache des verringerten Gerinnungspotentials auf. Zur Zeit wird die Leistungsschwäche der Leber (Parenchymschaden und Vitamin-K-Mangel) in den Vordergrund gestellt und als Ursache für die Verminderung des Gerinnungspotentials angesehen. Daß die Cholämie eine ursächliche Rolle spielen könnte, wird keineswegs bedacht. Autoren wie K.FORELL und F.KOLLER(5), sowie H.LASCH, H.HARTERT und K.SCHIMPF(12) verneinen sogar in ihren Arbeiten beiläufig diese Möglichkeit. "Auch für den direkten Zusammenhang (des Quickwertes) mit der Höhe des Bilirubinspiegels liegt kein Anhalt vor", schreibt P.GÖTTLEBE(6) 1950 unter der Überschrift: "Die Prothrombinbestimmung als Leberfunktionsprüfung".

Nur R.MARX(14) äußert in einer Veröffentlichung die Vermutung, daß die Hypocoagulämie beim Verschlußikterus nach Eintreten verminderten Prothrombinpotentials auch durch die Blutfarbstoffderivate und Gallensäuren indirekt verursacht werden könnte.

Im Verlauf dieser Arbeit soll der Einfluß des Blutfarbstoffderivates Bilirubin auf die Gerinnung experimentell untersucht werden.

III. METHODIK UND EIGENE VERSUCHE

Unsere Untersuchungen wären sehr einfach mittels in-vitro-Untersuchungen durch Zugabe von Bilirubin in verschiedenen Konzentrationen zu Plasmaproben durchzuführen gewesen. Die schlechte Löslichkeit von Bilirubin in einem wässrigen,

für die Durchführung der Gerinnungsteste geeigneten Lösungsmittel stellte jedoch ein bisher unüberwindliches Hindernis dar. Um dieses zu umgehen, nahmen wir darauf in-vivo-Untersuchungen an Kindern vor, deren Leberfunktion nach überstandener Hepatitis mittels der Bilirubinbelastungsprobe (nach G. von BERGMANN(1) und W.EILBOTT(4)) getestet wurde. Nach Injektionen der bei diesen Testen vorgesehenen Bilirubinmengen wurde aber nur 3,09 % Gesamtbilirubin erreicht. Mehr Bilirubin wurde nicht verabfolgt, um schädliche Wirkungen mit Sicherheit zu vermeiden. (Sämtliche Bestimmungen der Bilirubinkonzentration im Serum erfolgten nach L.JENDRASSIK und R.CLEGHORN(9)). Heparintoleranz-, Rekalzifizierungs- und Quickzeit (etc.) wiesen bei diesen Versuchen keine faßbaren Veränderungen auf. Um nun höhere Konzentrationen zu erreichen, gingen wir zu Tierversuchen über.

Durch Herzpunktionen wurden Kaninchen 0,15 g Bilirubin in 10 ml Sodalösung injiziert. Konzentrationsabstufungen stellten sich dadurch ein, daß die Versuche an Tieren verschiedenen Gewichts vorgenommen wurden. Das zur Gerinnungsbestimmung erforderliche Blut wurde unmittelbar vor und 30 Min. nach der Injektion ebenfalls aus dem Herzen entnommen (jeweils 5 ml Zitratblut und 3-4 ml Nativblut). Das Verhalten der Gerinnungsfaktoren wurde sofort sowohl in dem unbelasteten als auch in dem mit Bilirubin versetzten Blut getestet.

Es wurde Sorge getragen, daß die zu vergleichenden Blut- bzw. Plasmaproben unter denselben Bedingungen verarbeitet wurden (Zentrifugieren in einem Arbeitsgang, gleiche Gefäße etc.), Im Rahmen dieser Arbeit interessierten die Aktivitätsunterschiede der einzelnen Gerinnungsteilnehmer im Blut vor und nach der Injektion von Bilirubin. Ein Bezug der Werte auf die sonst gebräuchlichen Standardkurven unterblieb, da es lediglich auf absolute Gerinnungszeiten ankam und der Vergleich der mit oder ohne Bilirubinzusatz gewonnenen Werte den Aktivitätsunterschied direkt wiedergibt.

Die Meßwerte der Einphasenbestimmung (QUICK, Faktor II, Faktor V und Faktor VII) hatten eine nur sehr geringe methodische Unsicherheit. Die Fehlerbreite machte bei der "Quick-Zeit" $\pm 0,2 \%$, bei der Prothrombinbestimmung $\pm 0,6 \%$, bei der Faktor-V-Bestimmung $\pm 0,2 \%$ und Faktor-VII-Bestimmung $\pm 0,2 \%$ aus. Diese geringe Fehlerbreite erklärt sich aus der sehr guten Eignung des Kaninchenblutes für Gerinnungsbestimmungen. Der Gerinnungseintritt läßt sich hierbei besonders exakt erfassen, viel genauer als bei Untersuchungen am menschlichen Blut. Die Schwankungsbreite bei den Globaltesten, wie Heparintoleranzzeit und Rekalzifizierungszeit ist allerdings auch bei der Verwendung von Kaninchenblut erheblich größer. Sie beträgt $\pm 8,8 \%$ bzw. $\pm 8,7 \%$. Stets wurden 5 Bestimmungen gemacht und die Mittelwerte in den Tabellen notiert.

Um die Gesamtaktivität aller an der Gerinnung beteiligten Faktoren einer Prüfung zu unterziehen, bedienten wir uns der Rekalzifizierungszeit und des Heparintoleranztestes. Bei der Durchführung der Gerinnungsbestimmungen des Prothrombin-komplexes selbst und seiner einzelnen Faktoren hielten wir uns im wesentlichen an die QUICKschen Methoden in den von MARBET und WINTERSTEIN(15-17) beschriebenen Modifikationen. Einzelheiten werden später dargelegt.

Prinzip dieser Untersuchungsmethoden ist - kurz gesagt -, daß alle Faktoren mit Ausnahme des zu bestimmenden konstant gehalten werden. Das geschieht dadurch, daß man dem Plasma alle Faktoren, die nicht getestet werden sollen, im Überschuß zufügt, so daß die gestoppte Gerinnungszeit ein Maß für die Aktivität desjenigen Faktors ist, dem die Untersuchung gilt.

Die an der Thrombokinasbildung beteiligten Faktoren (VIII und IX/X) wurden schließlich mit Hilfe des modifizierten Thromboplastin-Generation-Tests (A.WINTERSTEIN, R.MARBET, R.STRÄSSLE(27)) untersucht..

Im einzelnen wurden die verschiedenen Gerinnungsbestimmungen wie folgt durchgeführt:

a) HEPARINTOLERANZZEITBESTIMMUNG

Reagenzien:

1. m/40-Chlorkalziumlösung
2. Heparinlösung zu 0,2 I.E. pro ml m/40 CaCl_2
(Ausgehend von Handels-Heparin-Präparaten zu 5000 I.E./ml ist folgende Verdünnung durchzuführen:
0,2 ml Heparinlösung enthaltend 5000 I.E. zu 9,8 ml
Aqua dest. = 1000 I.E./ml;
davon 0,1 ml zu 9,9 ml m/40 CaCl_2 -Lösung = 1 I.E./ml;
davon 2 ml zu 8 ml m/40 CaCl_2 -Lösung = 0,2 I.E./ml.)
3. Kaninchenzitratblut (1 Teil m/10 Natriumzitratlösung
zu 9 Teilen Kaninchenblut)

Durchführung der Bestimmung:

In ein Wasserbad, dessen Temperatur durch einen Thermostaten auf genau 37 Grad gehalten wird, werden 2 kleine Reagenzgläser ($\varnothing$ 9 mm) gehängt, die mit je 0,5 ml Kaninchenzitratblut beschickt werden. Mit einer Tuberkulinspritze wird dann 0,5 ml Heparinchlorkalziumlösung aufgezogen, die in einem Reagenzglas im Wasserbad hängt, und in eines der Gläser gespritzt. Gleichzeitig wird eine Stoppuhr in Gang gesetzt. Durch dreimaliges Umkippen sorgt man für gute Durchmischung. Das Gemisch bleibt eine Minute lang im Wasserbad ruhig hängen. Dann nimmt man das Gläschen alle 15 Sekunden heraus und neigt es vorsichtig um 180 Grad. Das Neigen des Gläschens hat immer in der gleichen Richtung zu geschehen. Der Zeitpunkt der Gerinnung läßt sich daran erkennen, daß das Reagenzglas um 180 Grad gedreht werden kann, ohne daß Blut ausfließt. Die mittels Stoppuhr festgestellte Zeit ist die Heparintoleranzzeit. Ebenso wird mit dem zweiten Reagenzgläschen verfahren. Ergibt sich eine Differenz von mehr als 15 Sekunden, so ist die Bestimmung zu wiederholen.

b) REKALZIFIZIERUNGSZEIT-BESTIMMUNG

Reagenzien:

1. m/40-Chlorkalziumlösung
2. Kaninchenzitratblut (1 Teil m/10-Natriumzitratlösung zu 9 Teilen Kaninchenblut)

Durchführung der Bestimmung:

Es wird jeweils 0,5 ml reine Chlorkalziumlösung zur Blutprobe gegeben. Im übrigen ist wie bei der Heparintoleranzzeitbestimmung zu verfahren (s.o.).

c) THROMBOPLASTINZEIT-BESTIMMUNG ("QUICK-ZEIT")

Reagenzien:

1. Thromboplastinlösung "Roche"
2. m/40-Chlorkalziumlösung
3. Kaninchenplasma, das 5 Minuten lang bei 2500 Umdrehungen/min zentrifugiert wurde

Durchführung der Bestimmung:

Ein im Wasserbad hängendes Reagenzgläschen ($\varnothing$ 9 mm) beschickt man mit 0,1 ml Kaninchenplasma. Darauf wird mit einer Tuberkulinspritze 0,1 ml Chlorkalziumlösung und 0,1 ml Thromboplastinlösung aufgezogen und unter Vermeidung von Schaumbildung bei gleichzeitiger Ingangsetzung einer Stoppuhr in das Gläschen eingespritzt. (Beide Lösungen sind im Wasserbad auf 37 Grad gewärmt). Den Gerinnungseintritt prüft man mit einem ausgeglühten Platinhäkchen, das gleichmäßig so lange in dem Gemisch bewegt wird, bis sich der erste Fibrinfaden zeigt und die Stoppuhr angehalten werden kann.

d) PROTHROMBINZEIT-BESTIMMUNG (FAKTOR-II-BESTIMMUNG)

Reagenzien:

1. Thromboplastinlösung "Roche"
2. m/40-Chlorkalziumlösung
3. Prothrombinfreies Testplasma,
- bestehend aus Rinderoxalatplasma, das mit BaSO_4 behandelt wurde und daher frei von Faktor II und Faktor VII ist, und aus Menschenblutserum, dem 5 % Thromboplastin zugesetzt wurde -.
4. Kaninchenplasma, das 5 Minuten lang bei 2500 Umdrehungen/min zentrifugiert wurde in einer Verdünnung von 1:2 (1 Teil Plasma auf 2 Teile 0,9 %ige Kochsalzlösung).

Durchführung der Bestimmung:

Ein im Wasserbad hängendes Reagenzgläschen ($\varnothing$ 9 mm) wird mit 0,1 ml verdünntem Kaninchenplasma und mit 0,1 ml prothrombinfreiem Test-Plasma versehen, darauf nach Zugabe von jeweils 0,1 ml Thromboplastin-Chlorkalziumgemisch mittels Stoppuhr und Platinhäkchen die Gerinnungszeit festgestellt.

e) FAKTOR-V-ZEIT-BESTIMMUNG

Reagenzien:

1. Thromboplastinlösung "Roche"
2. m/40-Chlorkalziumlösung
3. Faktor-V-freies Test-Plasma,
- Menschenblutoxalatplasma, das 3-5 Wochen lang im Kühlschrank gealtert ist.
4. Kaninchenplasma, das 5 Minuten lang bei 2500 Umdrehungen/min zentrifugiert wurde, in einer Verdünnung von 1:2 (1 Teil Plasma auf 2 Teile 0,9 %ige Kochsalzlösung).

Durchführung der Bestimmungen:

Wie bei der Prothrombinzeitbestimmung, aber an Stelle von prothrombinfreiem Plasma wird jeweils 0,1 ml Faktor-V-freies Testplasma hinzugefügt.

f) FAKTOR-VII-ZEIT-BESTIMMUNG

Reagenzien:

1. Thromboplastinlösung "Roche"
2. m/40-Chlorkalziumlösung
3. Faktor-VII-freies Testplasma, hergestellt aus 30 mg Reagenz Ro 1-8497/1, das in 1 ml Michaelispuffer gelöst wird.
4. Kaninchenplasma, das 5 Minuten lang bei 2500 Umdrehungen/min zentrifugiert wurde, in einer Verdünnung von 1:2 (1 Teil Plasma auf 2 Teile 0,9 %ige Kochsalzlösung).

Durchführung der Bestimmung:

Wie bei der Faktor-V-Zeit-Bestimmung, aber an Stelle von Faktor-V-freiem Testplasma wird jeweils 0,1 ml Faktor-VII-freies Testplasma zugegeben.

g) DER THROMBOPLASTIN-GENERATION-TEST

Reagenzien:

1. $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Plasma:
2 ml Kaninchenzitratplasma werden zweimal mit je 0,1 ml Aluminiumhydroxydsuspension ca. 1 Minute lang verrührt und danach 15 Minuten bei 3000 Umdrehungen/min zentrifugiert (0,1 ml dieses Plasmas darf beim Mischen mit 0,1 ml Serum, 0,1 ml Thromboplastin und 0,1 ml m/40- CaCl_2 bei 37 Grad innerhalb von 5 Minuten nicht gerinnen).

2. Serum:

2 ml Kaninchenzitratplasma werden mit 0,2 ml Thromboplastin und 1,8 ml $m/40\text{-CaCl}_2$ gemischt und bei 37 Grad so lange mit einem Glasstab verrührt, bis sich kein Fibrin mehr abscheidet. Hierauf bleibt es 1 Stunde lang im Wasserbad (37°). (0,1 ml dieses Serums darf beim Vermischen mit 0,1 ml $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Plasma, 0,1 ml Thromboplastin und 0,1 ml $m/40\text{-CaCl}_2$ bei 37 Grad innerhalb von 5 Minuten nicht gerinnen.)

3. Plättchenextrakt:

Verwendet wird Plättchenextrakt (Ro 1-8791) von der Deutschen Hoffmann-La Roche, hergestellt aus Zitratrinderblut. Der Inhalt einer Ampulle, enthaltend 90 mg Extrakt, wird in 12 ml Aqua dest. gelöst.

4. Plättchenfreies Substratplasma:

Als plättchenfreies Substratplasma nimmt man normales, nicht mehr als 12 Stunden altes Kaninchenzitratplasma, das durch 15 Minuten langes Zentrifugieren bei 3000 Umdrehungen/min gewonnen wird.

Durchführung der Bestimmung:

Bestimmung der Faktor-VIII-Aktivität:

Kaninchen- $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Plasma wird 1:19 mit Michaelispuffer verdünnt. 0,5 ml des verdünnten $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Plasmas versetzt man nacheinander mit 0,5 ml normalem Kaninchenserum (1:4 verdünnt), mit 0,5 ml Plättchenextrakt und 0,5 ml $m/40\text{-CaCl}_2$.

Unmittelbar nach der Chlorkalziumzugabe wird eine Stoppuhr in Gang gesetzt und das Inkubationsgemisch ins Wasserbad (37°) gehängt. Dann hängt man 6 Reagenzgläschen ($\varnothing$ 9 mm) mit je 0,1 ml Substratplasma ebenfalls ins Wasserbad. Nach 5 Minuten Inkubationszeit entnimmt man dem Inkubationsgemisch mittels einer Tuberkulinspritze 0,1 ml, zieht dazu 0,1 ml $m/40\text{-CaCl}_2$ auf und spritzt dieses Gemisch in eines der 6 Gläschen, enthaltend 0,1 ml Substratplasma. Die erhaltene Plasma-Thromboplastinzeit wird notiert. Nach weiteren 5 Minuten wird das-

selbe wiederholt und hierauf immer nach 2 Minuten. Die Bestimmungen sind so lange auszuführen, bis die Gerinnungszeiten nicht mehr kürzer werden.

Bestimmung der Aktivität der Serumfaktoren:

Kaninchenserum wird 1:19 mit Michaelispuffer verdünnt. 0,5 ml normales $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Kaninchenplasma (1:4 verdünnt) versetzt man mit 0,5 ml desjenigen Kaninchenserums, das untersucht werden soll (1:19 verdünnt) und gibt dazu 0,5 ml Plättchenextrakt und 0,5 ml m/40- CaCl_2 . Dann bestimmt man wie oben die Gerinnungszeiten im Substratplasma.

Abb. 1 VERHALTEN VON GERINNUNGSFAKTOREN IM KANINCHENBLUT VOR UND NACH INJEKTION VON SODALÖSUNG (Leerversuch)

A. Globalteste und Faktoren des Prothrombinkomplexes:

I =  = Gerinnungswerte vor der Injektion von Na₂CO₃-Lösung

II =  = Gerinnungswerte nach der Injektion von 10 ml Na₂CO₃-Lösung (1,85%)

I II
(Mittel- (Mittel-
werte) werte)

Heparintoleranzzeit	95"	96"
Rekalzifizierungszeit	79"	82"
Thromboplastinzeit (Quickzeit)	9,1"	9,1"
Faktor-II-Zeit	11,1"	11,1"
Faktor-V-Zeit	9,1"	9,0"
Faktor-VII-Zeit	12,0"	12,1"

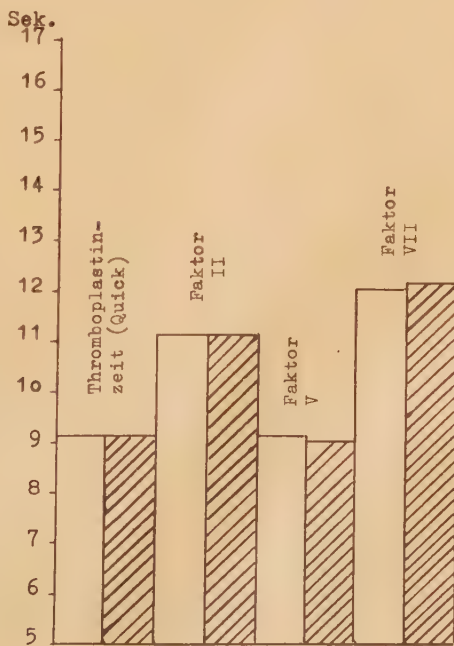
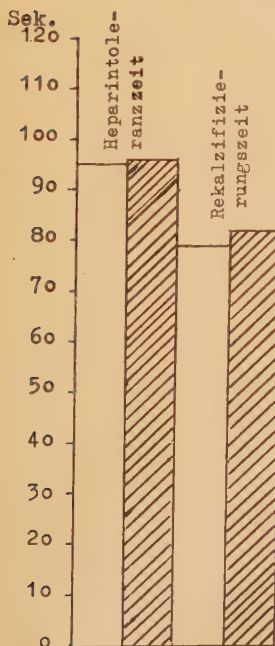


Abb.2 VERHALTEN VON GERINNUNGSFAKTOREN IM KANINCHENBLUT VOR UND NACH INJEKTION VON BILIRUBIN

A. Globalteste und Faktoren des Prothrombinkomplexes:

I =		Gesamtbilirubin	0,5 mg%
		direkt	0
		indirekt	0,5 mg%
II =		Gesamtbilirubin	10,6 mg%
		direkt	0,3 mg%
		indirekt	10,3 mg%

I II Verlängerung
(Mittel- (Mittel- in Prozent des
werte) werte) Ausgangswertes

Heparintoleranzzeit	83"	94"	13,4%
Rekalzifizierungszeit	60"	76"	26,7%
Thromboplastinzeit (Quickzeit)	8,7"	9,7"	11,5%
Faktor-II-Zeit	10,3"	10,7"	3,9%
Faktor-V-Zeit	8,6"	8,6"	-
Faktor-VII-Zeit	10,9"	11,6"	6,4%

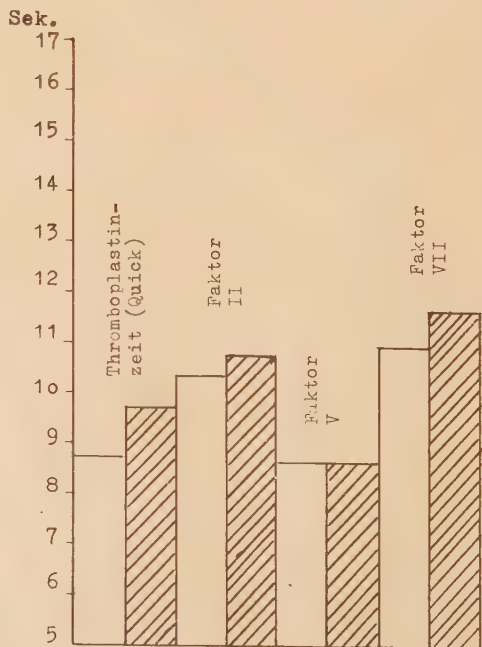
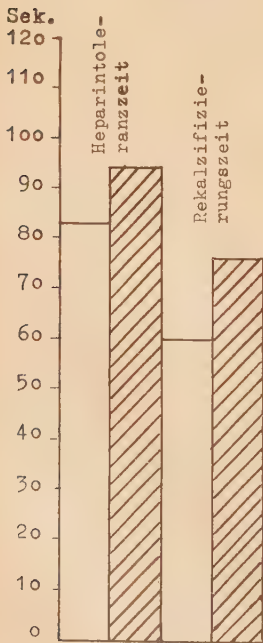


Abb.3 VERHALTEN VON GERINNUNGSFAKTOREN IM KANINCHENBLUT VOR UND NACH INJEKTION VON BILIRUBIN

A. Globalteste und Faktoren des Prothrombinkomplexes:

I		Gesamtbilirubin	0,4 mg%
		direkt	0
		indirekt	0,4 mg%
II		Gesamtbilirubin	13,5 mg%
		direkt	0
		indirekt	13,5 mg%

	I (Mittel- werte)	II (Mittel- werte)	Verlängerung in Prozent des Ausgangswertes
Heparintoleranzzeit	89"	92"	3,4%
Rekalzifizierungszeit	78"	80"	2,6%
Thromboplastinzeit (Quickzeit)	8,0"	8,9"	11,2%
Faktor-II-Zeit	11,5"	12,4"	7,8%
Faktor-V-Zeit	9,6"	9,6"	-
Faktor-VII-Zeit	12,0"	14,0"	16,7%

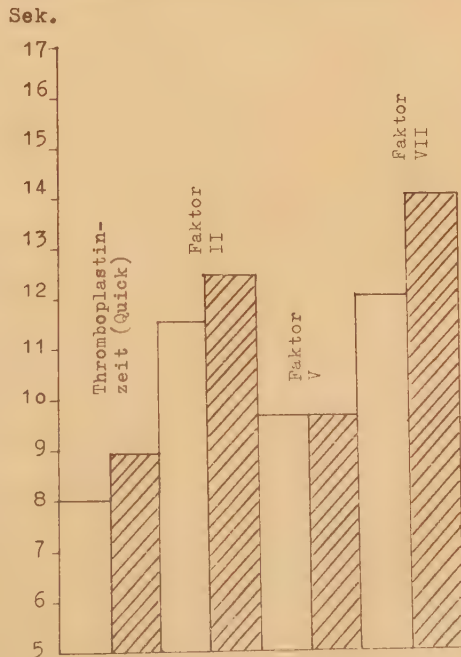
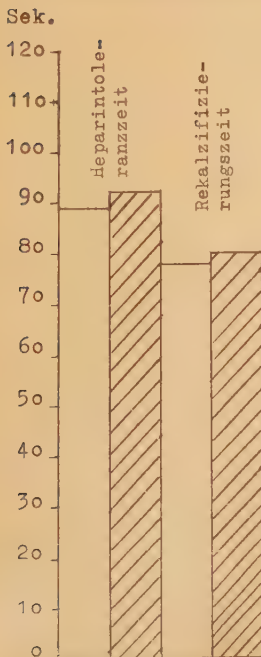


Abb.4 VERHALTEN VON GERINNUNGSFAKTOREN IM KANINCHENBLUT VOR UND NACH INJEKTION VON BILIRUBIN

A. Globalteste und Faktoren des Prothrombinkomplexes:

I	=		=	Gesamtbilirubin	0,5 mg%
				direkt	0
				indirekt	0,5 mg%
II	=		=	Gesamtbilirubin	17,8 mg%
				direkt	0,2 mg%
				indirekt	17,5 mg%

	I (Mittel- werte)	II (Mittel- werte)	Verlängerung in Prozent des Ausgangswertes
Heparintoleranzzeit	86"	95"	10,5%
Rekalzifizierungszeit	67"	74"	10,4%
Thromboplastinzeit (Quickzeit)	9,5"	14,0"	36,9%
Faktor-II-Zeit	11,3"	13,2"	16,8%
Faktor-V-Zeit	8,8"	8,8"	-
Faktor-VII-Zeit	12,6"	16,5"	31,0%

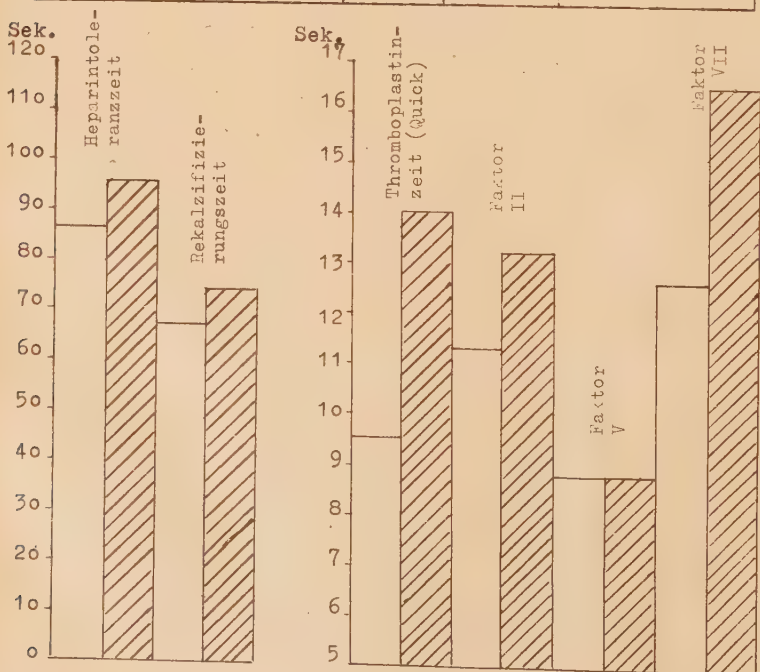


Abb.5 VERHALTEN VON GERINNUNGSPAKTOREN IM KANINCHENBLUT VOR UND NACH INJEKTION VON BILIRUBIN

A. Globalteste und Faktoren des Prothrombinkomplexes:

I =  = Gesamtbilirubin 0,7 mg%
 direkt 0,1 mg%
 indirekt 0,6 mg%

II =  = Gesamtbilirubin 24,0 mg%
 direkt 0,8 mg%
 indirekt 23,2 mg%

	I (Mittel- werte)	II (Mittel- werte)	Verlängerung in Prozent des Ausgangswertes
Heparintoleranzzeit	88"	104"	18,2%
Rekalzifizierungszeit	63"	99"	57,2%
Thromboplastinzeit (Quickzeit)	8,7"	12,0"	38,0%
Faktor-II-Zeit	10,5"	16,0"	52,3%
Faktor-V-Zeit	8,6"	9,8"	13,9%
Faktor-VII-Zeit	11,0"	16,1"	46,3%

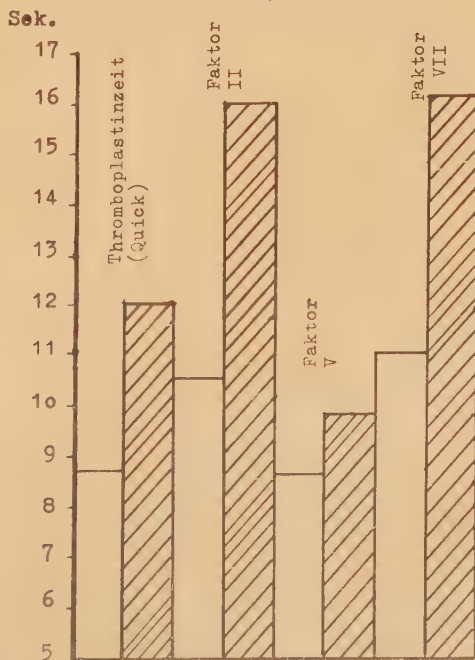
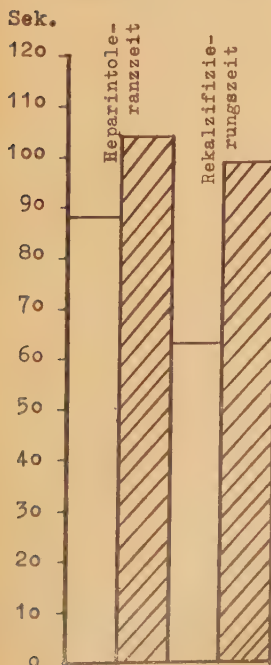


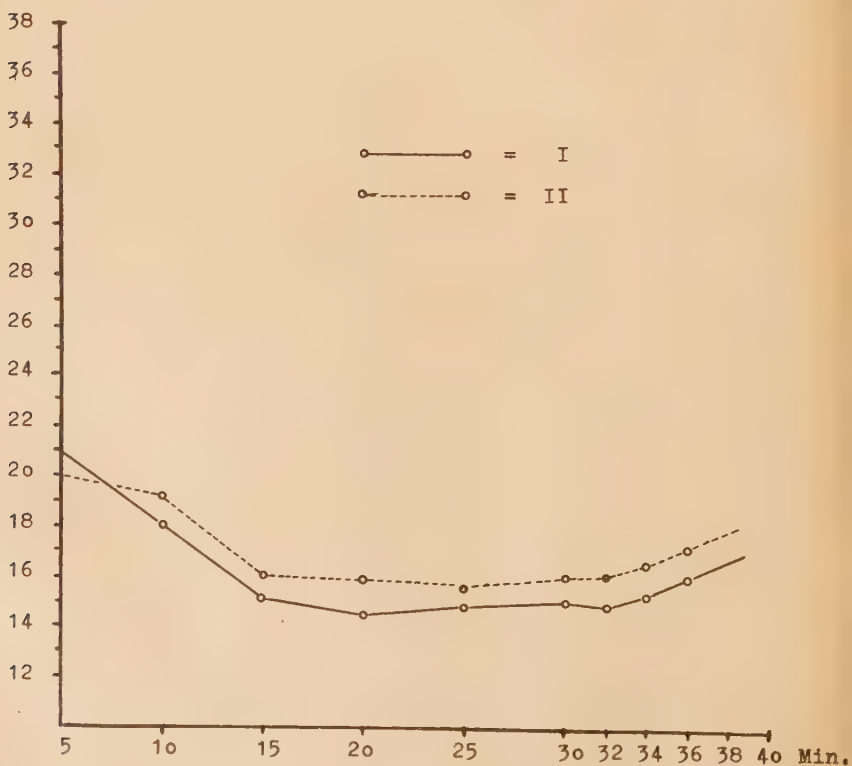
Abb.6 VERHALTEN VON GERINNUNGSFAKTOREN IM KANINCHENBLUT VOR UND NACH INJEKTION VON BILIRUBIN

B. Thromboplastin-Generation-Test: F a k t o r VIII

I =	Gesamtbilirubin	0,3 mg%
	direkt	0
	indirekt	0,3 mg%
II =	Gesamtbilirubin	29,9 mg%
	direkt	0,1 mg%
	indirekt	29,8 mg%

Inkubations-zeit:	5'	10'	15'	20'	25'	30'	32'	34'	36'
I	21,0"	18,0"	15,2"	14,5"	14,7"	15,0"	14,9"	15,2"	16,0"
II	20,0"	19,2"	16,0"	15,9"	15,5"	16,0"	16,2"	16,5"	17,2"

Sek.



5.7 VERHALTEN VON GERINNUNGSFAKTOREN IM KANINCHENBLUT VOR UND NACH
INJEKTION VON BILIRUBIN

B. Thromboplastin-Generation-Test: Serumfaktoren IX und X

I	=	Gesamtbilirubin	0,3 mg%
		direkt	0,0
		indirekt	0,3 mg%
II	=	Gesamtbilirubin	29,9 mg%
		direkt	0,1 mg%
		indirekt	29,8 mg%

Inkubations- zeit:	5'	10'	15'	20'	25'	30'	32'	34'	36'
I	29,9"	23,9"	22,0"	21,6"	21,3"	21,9"	23,0"	24,0"	24,9"
II	31,4"	23,2"	21,8"	21,0"	21,2"	21,4"	23,4"	23,6"	24,6"

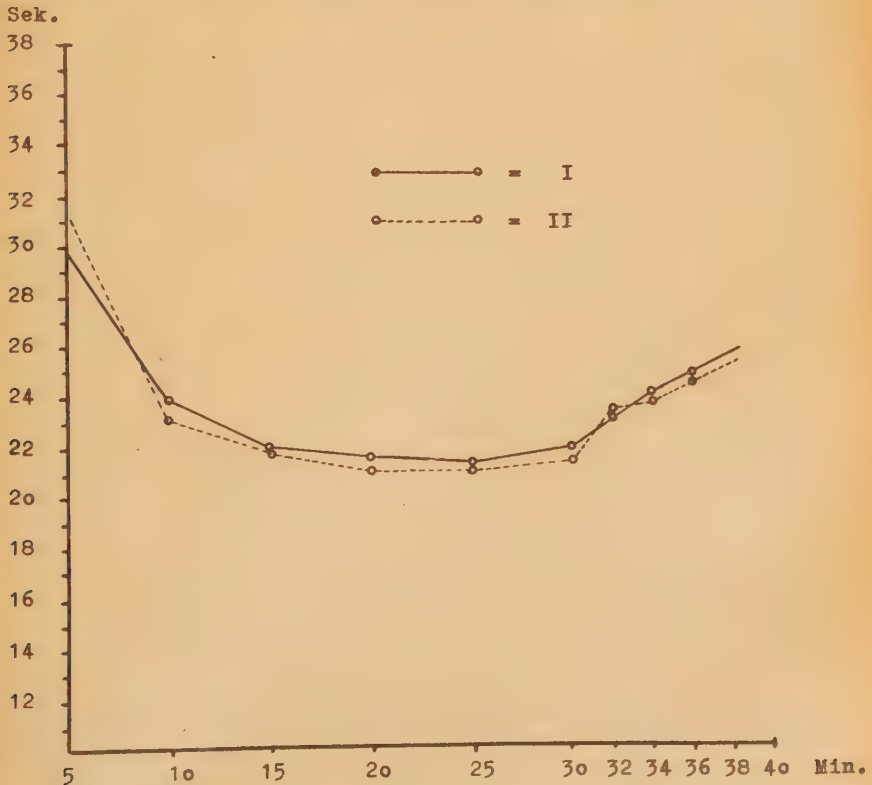


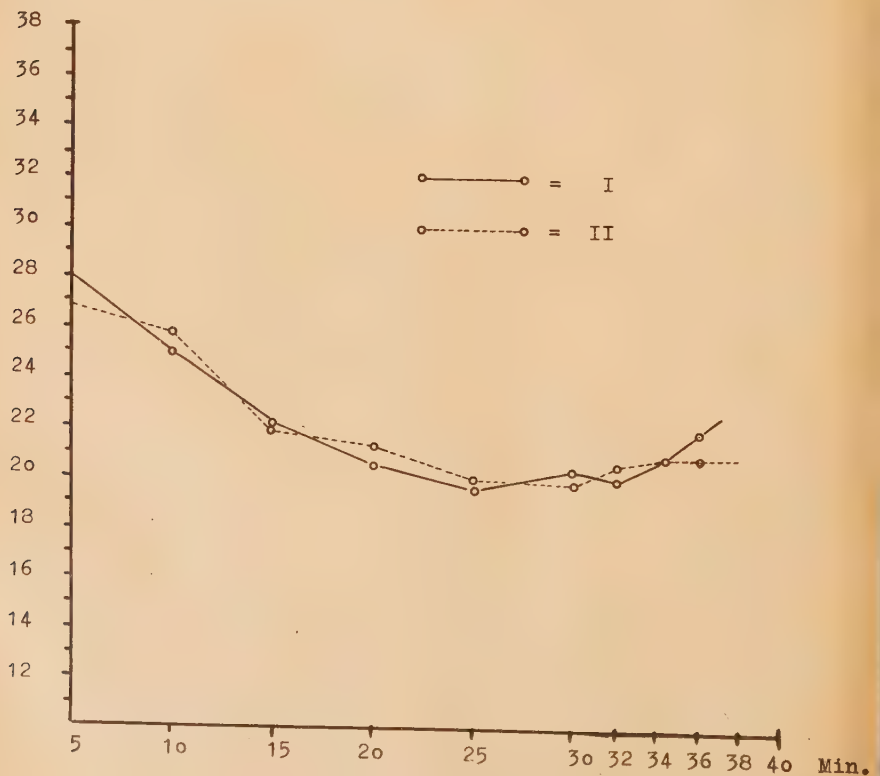
Abb. 9 VERHALTEN VON GERINNUNGSPAKTOREN IM KANINCHENBLUT VOR UND NACH INJEKTION VON BILIRUBIN

B. Thromboplastin-Generation-Test: F a k t o r VIII

I	=	Gesamtbilirubin	0,5 mg%
		direkt	0
		indirekt	0,5 mg%
II	=	Gesamtbilirubin	31,5 mg%
		direkt	0,8 mg%
		indirekt	30,7 mg%

Inkubations-zeit:	5'	10'	15'	20'	25'	30'	32'	34'	36'
I	28,0"	25,0"	22,2"	20,7"	19,5"	20,2"	20,0"	20,7"	21,9"
II	26,8"	25,9"	22,0"	21,3"	20,0"	19,8"	20,6"	20,8"	20,8"

Sek.

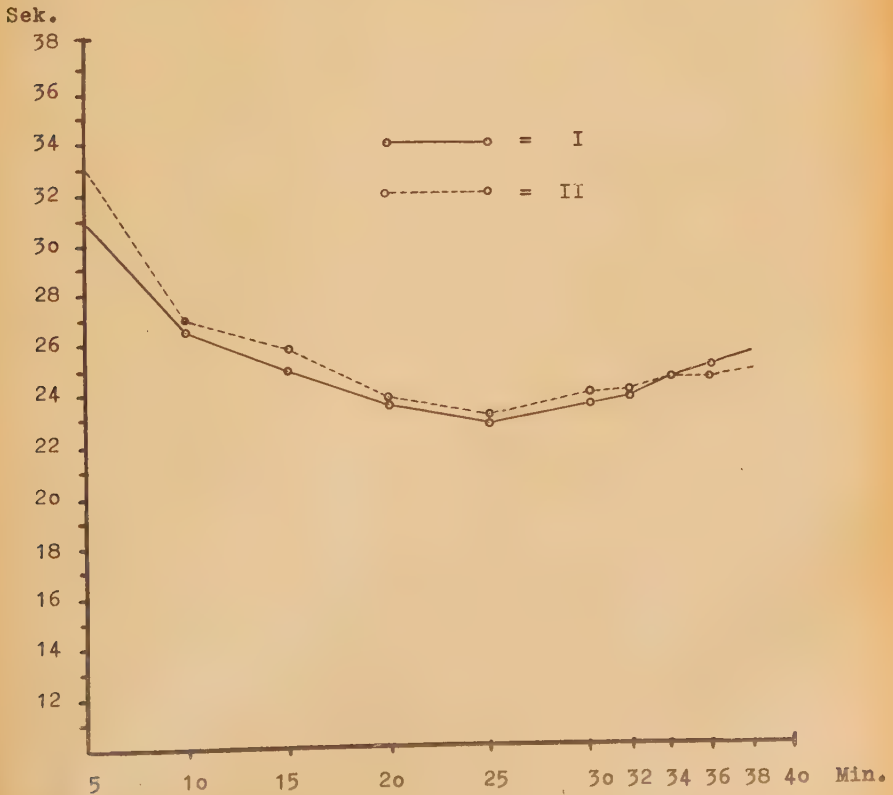


9. VERHALTEN VON GERINNUNGSFAKTOREN IM KANINCHENBLUT VOR UND NACH INJEKTION VON BILIRUBIN

B. Thromboplastin-Generation-Test: Serumfaktoren IX und X

I =	Gesamtbilirubin	0,5 mg%
	direkt	0
	indirekt	0,5 mg%
II =	Gesamtbilirubin	31,5 mg%
	direkt	0,8 mg%
	indirekt	30,7 mg%

Inkubations-zeit:	5'	10'	15'	20'	25'	30'	32'	34'	36'
I	31,0"	26,5"	25,0"	23,6"	22,8"	23,5"	23,9"	24,5"	25,0"
II	33,2"	27,0"	25,8"	23,8"	23,0"	23,9"	24,0"	24,5"	24,6"



IV. ERGEBNISSE

Vor Beginn der eigentlichen Bilirubininjektionen mußten wir uns durch "Leerversuch" mit 10 ml 1,85 %iger Sodalösung vergewissern, daß dieses Lösungsmittel keine Veränderungen des Gerinnungspotentials hervorruft. Wie aus Abb.1 zu entnehmen ist, war dies der Fall. Bei den weiteren Versuchen mit Bilirubin zeigte sich dann, daß mit steigender Bilirubinkonzentration im Blut die Globalteste sowohl als auch die Bestimmung der einzelnen Faktoren des Prothrombinkomplexes in verschieden starkem Maß Aktivitätsabnahmen erbrachten (Abb.2 bis Abb.5).

Während bei einem Serumbilirubinspiegel von 10,6 mg% Gesamtbilirubin die Faktoren des Prothrombinkomplexes und die Thromboplastinzeit nur Aktivitätsminderungen unter einer Sekunde aufweisen (Abb.2), ist der Faktor VII bei einem Bilirubinspiegel von 13,5 mg% schon genau um 2 Sekunden (= 16,7 %) verlängert (Abb.3).

Wie bereits erwähnt, ist die Feststellung der Gerinnungszeiten von Kaninchenblut sehr exakt möglich, weil der Gerinnungseintritt (Bildung des ersten Fibrinfadens) auch dem weniger Geübten sehr deutlich sichtbar wird, d.h. die in den Tabellen aufgeführten Mittelwerte sind oft einer Reihe von 5 genau gleichen Abstoppszeiten entnommen.

Die Ergebnisse bei den Untersuchungen der einzelnen Faktoren im Kaninchenblut sind zweifellos bemerkenswert und wertvoll, wobei besonders das Verhalten der Faktoren des Prothrombinkomplexes von großem Interesse sein muß. Zeigen doch Abb.4 und Abb.5 ganz deutliche Verlängerungen sowohl der Thromboplastinzeit (36,9 % und 38 %), wie auch der Faktor-II-Zeit (16,8 % und 52,3 %) und Faktor-VII-Zeit (31,0 % und 46,3 %), während Faktor V sich bei allen Versuchen so gut wie völlig indifferent verhält und erst bei der höchsten Bilirubinkonzentration (Abb.5) geringgradig beeinflusst wird (13,9%).

Bei den Thromboplastinbildnern (Faktor VIII und Faktor IX/X) konnte dagegen durch unsere Versuche keine deutliche Beeinträchtigung der Gerinnungsaktivität nach Bilirubininjektion nachgewiesen werden (Abb.6 bis Abb.9). Die Gerinnungszeiten sind hier im bilirubinhaltigen Plasma bzw. Serum teils etwas länger, teils etwas kürzer.

V. DISKUSSION

Die Veränderungen, welche sich in unseren Versuchen hauptsächlich bei den Faktoren des Prothrombinkomplexes zeigen, lassen erkennen, daß Bilirubin einen eindeutigen, nicht zu vernachlässigenden Einfluß auf die Blutgerinnung ausübt.

Im bilirubinversetzten Blut und Plasma konnten Verlängerungen der Heparintoleranz-, Rekalkifizierungs- und QUICK-Zeit, ferner Aktivitätsminderungen von Faktor II, Faktor VII und auch geringgradig von Faktor V beobachtet werden.

Die Thromboplastinbildner (VIII, IX/X) wurden dagegen durch Bilirubin nicht beeinflusst.

Falls das menschliche Blut auf Bilirubin in ähnlicher Weise reagiert - was wahrscheinlich der Fall ist - muß daran gedacht werden, daß eine höhergradige Bilirubinämie schon an sich das Gerinnungspotential beeinträchtigen kann.

Es braucht dann durchaus nicht immer eine Schädigung des Leberparenchyms oder ein Vitamin-K-Mangel vorzuliegen. Das bedeutet also, daß beispielsweise auch bei einem hämolytischen Ikterus Gerinnungsstörungen auftreten können.

Hier sei darauf hingewiesen, daß injiziertes Bilirubin die indirekte Diazo-Reaktion gibt. Diese Ergebnisse gelten daher nur für indirekt reagierendes, nicht an Glukuronsäure gekoppeltes Bilirubin. Direkt reagierendes Bilirubin wird sich jedoch in Bezug auf die Gerinnung sicherlich nicht anders verhalten.

Wie unsere Versuche zeigen, wird die Aktivität von Faktor V durch Bilirubin nur sehr wenig und erst bei hoher Konzentration vermindert. Offensichtlich ergeben sich hierbei sehr bemerkenswerte Parallelen zu den Ergebnissen der bisherigen Gerinnungsanalysen bei Stauungsikterus und Leberparenchymschäden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die alte Bezeichnung "cholämische Blutung" bei hämolytischem und Stauungsikterus, wie überhaupt bei ikterischen Hepatopathien, allem Anschein nach doch eine Berechtigung hat.

Über den Angriffsmechanismus des Bilirubins können in dieser Arbeit allerdings noch keine Angaben gemacht werden. Auch muß der Einfluß der Gallensäuren auf die Gerinnung einer späteren Untersuchung vorbehalten bleiben.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Untersuchung des Einflusses von Bilirubin auf die Blutgerinnung werden an 7 Kaninchen Versuche angestellt. Beim Leerversuch zeigt sich, daß 10 ml 1,85 %ige Sodalösung die Thromboplastinzeit, Faktor-II-, Faktor-V- und Faktor-VII-Zeit sowie Heparintoleranz- und Rekalzifizierungszeit nicht beeinflussen, dagegen werden nach Injektion von 100 bis 150 mg Bilirubin (in 10 ml 1,85 %iger Sodalösung) deutliche Veränderungen bei diesen Bestimmungen festgestellt. Es besteht eine Abhängigkeit von der Konzentration des Serum-bilirubins in dem Sinne, daß mit Zunahme der Bilirubinkonzentration die Faktor-II-, Faktor-VII- und bei der höchsten Konzentration (24,1 mg%) auch die Faktor-V-Zeit länger werden. Die zur Thrombokinasenbildung notwendigen Faktoren zeigen dagegen nach der Injektion von Bilirubin keine auffälligen Veränderungen.

Herrn Prof. Dr. J. Ströder danke ich für die gebotene Möglichkeit, im gerinnungsphysiologischen Labor der Universitäts-Kinderklinik zu arbeiten, sowie für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. W. Künzler möchte ich meinen ganz besonderen Dank für die Überlassung des Themas und für seine wertvollen Ratschläge bei der Abfassung dieser Arbeit aussprechen.

Ferner gilt mein Dank der med.-techn. Assistentin Frä. I. Lehr, die mir unermüdlich bei der Durchführung der Herzpunktionen an Kaninchen geholfen hat.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. v.BERGMA^NN, G.: Klin.Wschr.6,776 (1927)
2. BUTT, H., A.SNELL Proc.Staff Meet. of the Mayo Clinic
und A.OSTERBERG: 13,74 (1938)
3. DAM, H. u. The Lancet 1,720 (1938)
J.GLAVID:
4. EILBOTT, W.: Z.klin.Med.106,529 (1927)
5. FORELL, M. und Münch.med.Wschr.95,433 (1953)
F. KOLLER:
6. GOTTLEBE, P.: Dtsch.Arch.klin.Med.197,397 (1950)
7. JÜRGENS, J.: Materia med. Nordmark VIII/10 (1956)
8. JÜRGENS, R.: Act.haematol.7,143 (1952)
9. JENDRASSIK, L. und Biochem.Z.289,1 (1936)
R.CLEGHORN:
10. KOLLER, F.: Dtsch.med.Wschr.14,516 (1956)
11. KOLLER, F., Act.haematol.6,1 (1951)
A.LOELIGER und
F.DUCKERT:
12. LASCH, H., H.HARTERT,Dtsch.Arch.klin.Med.203,52 (1956)
K.SCHIMPF et al.:
13. LINKE, A. und Dtsch.Arch.klin.Med.200,290 (1953)
H.LASCH:
14. MARX, R.: Ärztl.Forsch.6,136 (1952)
15. MARBET, R. und "Faktor VII" Werksverlag Hoffmann-
A.WINTERSTEIN: La Roche 21.IV.54
16. MARBET, R. und "Faktor V" Werksverlag Hoffmann-
A.WINTERSTEIN: La Roche 2.IX.54
17. MARBET, R. und "Prothrombin" Werksverlag Hoffmann-
A.WINTERSTEIN: La Roche, Dezember 1954
18. MARBET, R. und Ärztl.Forsch.9,460 (1955)
A.WINTERSTEIN:

19. OWEN, C. und J.BOLLMANN: Proc.Soc.Exp.Biol. N.Y. 67,231 (1948)
20. OWREN, P.: Scand.J.Clinic.Lab.Invest.3,168 (1951)
21. OWREN, P.: Persönliche Mitteilung
Ärztl.Forsch.6,136 (1952)
zit.nach R.MARX
22. PERLICK, E.: Z.exper.Med.116,540 (1951)
23. QUICK, A.: J.biol.Chem.109,1 (1935)
24. QUICK, A. und M.STEFANINI: J.Lab.Clin.Med.34,1203 (1949)
25. WARNER, E., K.BRINK- Arch.Amer.Path.18,587 (1934)
HOUS und H.SMITH:
26. WEDELS, G.: zit.nach A.J.QUICK:
"The hemorrhagic diseases",
Charles C.Thomas, Springfield,
Ill. 1942
27. WINTERSTEIN, A., R.MARBET u.
R.STRÄSSLE: "Vorschlag für einen modifizierten
Thromboplastin-Generation-Test und
eines für die Humantherapie geeig-
neten Präparates von antihämphilem
Globulin"
Sonderdruck, Wissenschaftliche Aus-
stellung auf dem 5.Europäischen Hä-
matologenkongreß Freiburg 20. bis
24.9.1955
28. WITTE, S.: Medizinische 31/32,1072 (1955)
29. WITTE, S. und P.DIRNBERGER: Klin.Wschr.31,781 (1953)

LEBENS LAUF

Am 10. Juli 1920 wurde ich als Sohn des Studienrates Dr.phil. Gerhard Ohling und seiner Ehefrau Gertrug Ohling, geb. Liebner, in Oldenburg i./O. geboren.

Vom 6. bis zum 10. Lebensjahr besuchte ich in Aurich/Ostfriesland die Volksschule und wechselte darauf in derselben Stadt zum humanistischen Gymnasium über. Nach Versetzung in die Obersekunda verließ ich 1937 diese Anstalt und fuhr bis 1939 zur See. Anschließend bereitete ich mich in Ilmenau/Thür. auf das Abitur vor. Im Herbst 1940 erhielt ich dort anlässlich meiner Einberufung zur Kriegsmarine von der Goethe-Oberschule das Zeugnis der Reife (Reifevermerk).

Bis zum Jahre 1944 war ich auf Geleitschutz- und Sicherungsbooten im englischen Kanal und im Mittelmeer eingesetzt. Gegen Ende des Krieges wurde meine Einheit der Infanterie in Oberitalien angegliedert, wo ich im April 1945 in amerikanische Kriegsgefangenschaft geriet. Später wurde ich nach Frankreich transportiert und am 26. Juni 1948 von dort entlassen.

Nachdem ich dann 4 Jahre lang Beamter beim damaligen Deutschen Paßkontrolldienst gewesen war, konnte ich im Frühjahr 1953 an der Universität Münster das Studium der Zahnheilkunde beginnen. Zum Sommersemester 1954 übersiedelte ich nach Würzburg und bestand im März 1955 an der Julius-Maximilians-Universität das Physikum.

Am 3. Juli 1957 beendete ich an dieser Universität mein Studium mit der Zahnärztlichen Prüfung.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Friedrich Ohling

